

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 08-266287

(43)Date of publication of application : 15.10.1996

(51)Int.Cl.

C12N 15/09  
 C07H 21/04  
 C07K 14/395  
 C12C 11/02  
 C12N 1/19  
 C12P 21/02  
 //(C12N 15/09  
 C12R 1:865 )  
 (C12N 1/19  
 C12R 1:865 )  
 (C12P 21/02  
 C12R 1:865 )

(21)Application number : 07-108688

(71)Applicant : KIRIN BREWERY CO LTD

(22)Date of filing : 02.05.1995

(72)Inventor : KOBAYASHI OSAMU  
 HAYASHI NOBUYUKI  
 SONE HIDETAKA

(30)Priority

Priority number : 07 15449    Priority date : 01.02.1995    Priority country : JP

## (54) GENE FOR IMPARTING COHESIVE PROPERTY TO YEAST AND ITS GENE PRODUCT

(57)Abstract:

**PURPOSE:** To obtain a new protein containing a polypeptide having a specific amino acid sequence, exhibiting activity capable of imparting a beer yeast type cohesive property to yeast and capable of controlling cohesive property of yeast affecting taste of a product in brewing beer, wine, etc.

**CONSTITUTION:** In brewing alcoholic drinks such as beer and wine containing a polypeptide having an amino acid sequence containing an amino acid sequence expressed by the formula and having activity imparting a beer yeast type cohesive property to yeast, this new protein is capable of controlling cohesive property of yeast by imparting or reinforcing a cohesive property affecting taste of the product or losing or reducing a beer yeast type cohesive property. The protein is obtained by extracting total DNA by an ordinary method from cohesive beer yeast, carrying out polymerase chain reaction(PCR) using a part of FL01 gene which participates in cohesive property of yeast as a primer and using total DNA as a template to carry out cloning of DNA, integrating the resultant DNA into a vector to introduce the DNA into a host cell and expressing the DNA in the host cell.

Met	Thr	Ile	Ala	His	His	Cys	Ala	Pro	Leu	Val	Ile	Leu	Ala	Pro	Leu
2				5						11					15
Gly	Leu	Leu	Asp	Val	Ala	Ser	Gly	Ser	Val	Glu	Ala	Cys	Leu	Pro	Val
				21				25							30
								1							
								1							
								1							
								1							
112	Val	Cys	Ser	Asp	Ala	Lys	Val	Leu	Ala	Asp	Leu	Pro	Val	Ser	Val
				195				200				205			
Val	Leu	Pro	Asp	Gly											
				210											

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2000 Japanese Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

## (12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平8-266287

(43) 公開日 平成8年(1996)10月15日

(51) Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/09	Z N A	9162-4B	C 1 2 N 15/00	Z N A A
C 0 7 H 21/04			C 0 7 H 21/04	B
C 0 7 K 14/395		8517-4H	C 0 7 K 14/395	
C 1 2 C 11/02			C 1 2 C 11/02	
C 1 2 N 1/19		8828-4B	C 1 2 N 1/19	
審査請求 未請求 請求項の数21 O L (全 21 頁) 最終頁に続く				

(21) 出願番号 特願平7-108688

(22) 出願日 平成7年(1995)5月2日

(31) 優先権主張番号 特願平7-15449

(32) 優先日 平7(1995)2月1日

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(71) 出願人 000253503

麒麟麦酒株式会社

東京都中央区新川二丁目10番1号

(72) 発明者 小林 統

神奈川県横浜市金沢区福浦1-13-5 麒麟

麦酒株式会社基盤技術研究所内

(72) 発明者 林 伸之

神奈川県横浜市鶴見区生麦1丁目17-1

麒麟麦酒株式会社技術部ビール研究所内

(72) 発明者 曾根 秀隆

神奈川県横浜市金沢区福浦1-13-5 麒麟

麦酒株式会社基盤技術研究所内

(74) 代理人 弁理士 平木 祐輔 (外1名)

(54) 【発明の名称】 酵母に凝集性を付与する遺伝子及びその遺伝子産物

(57) 【要約】 (修正有)

【構成】 酵母にビール酵母型凝集性を付与する活性を有する蛋白、蛋白をコードするDNA、DNAを含むプラスミド、DNAを利用して、ビール酵母型凝集性を付与または強化された酵母を製造する方法およびビール酵母型凝集性が欠失または減少した酵母を製造する方法、並びに、DNAの発現を抑制することによって、酵母のビール酵母型凝集性を欠失または減少させる方法。

【効果】 酵母にビール酵母型凝集性を付与する活性を有するLg-F101蛋白、ならび該蛋白をコードするLg-F101遺伝子DNAが提供される。即ち、このDNAを核外および(または)核内遺伝子として酵母細胞内に導入することによって、酵母にビール酵母型凝集性を付与したり、酵母のビール酵母型凝集性を強化することができる。

(2)

特開平 8-266287

1

2

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 実質的に配列表の配列番号1に示したアミノ酸配列を有するポリペプチドを含み、酵母にビール酵母型凝集性を付与する活性を有する蛋白。

【請求項2】 実質的に配列表の配列番号1に示したアミノ酸配列のうち、25番目のアミノ酸残基から213番目のアミノ酸残基を含むアミノ酸配列を有するポリペプチドを含み、酵母にビール酵母型凝集性を付与する活性を有する蛋白。

【請求項3】 実質的に配列表の配列番号1に示したアミノ酸配列のうち、少なくとも25番目のアミノ酸残基から97番目のアミノ酸残基を含むアミノ酸配列を有するポリペプチドを含み、酵母にビール酵母型凝集性を付与する活性を有する蛋白。

【請求項4】 酵母にビール酵母型凝集性を付与する活性を有し、実質的に配列表の配列番号2に示したアミノ酸配列を有するポリペプチド。

【請求項5】 実質的に配列表の配列番号1に示したアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする塩基配列を含むDNA。

【請求項6】 実質的に配列表の配列番号1に示したアミノ酸配列のうち、25番目のアミノ酸残基から213番目のアミノ酸残基を含むアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする塩基配列を含むDNA。

【請求項7】 実質的に配列表の配列番号1に示したア\*

\*ミノ酸配列のうち、少なくとも25番目のアミノ酸残基から97番目のアミノ酸残基を含むアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする塩基配列を含むDNA。

【請求項8】 酵母にビール酵母型凝集性を付与する活性を有する蛋白をコードする塩基配列を含み、配列表の配列番号3に示した塩基配列のうち、59番目の塩基から697番目の塩基を含むDNA またはその相補鎖。

【請求項9】 酵母にビール酵母型凝集性を付与する活性を有する蛋白をコードする塩基配列を含み、配列表の配列番号3に示した塩基配列のうち、131番目の塩基から697番目の塩基を含むDNA またはその相補鎖。

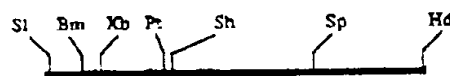
【請求項10】 酵母にビール酵母型凝集性を付与する活性を有する蛋白をコードする塩基配列を含み、配列表の配列番号3に示した塩基配列のうち、131番目の塩基から349番目の塩基を含むDNA またはその相補鎖。

【請求項11】 配列表の配列番号4に示した塩基配列を含み、酵母にビール酵母型凝集性を付与する活性を有するポリペプチドをコードするDNA またはその相補鎖。

【請求項12】 プラスミドTKYT2、YESKT2、またはKNWtC3に組み込まれ、酵母にビール酵母型凝集性を付与する活性を有する蛋白をコードする塩基配列を含むDNA。

【請求項13】 プラスミドTKYT2 に組み込まれ、以下の制限地図を有する約9 kbのDNA 断片である請求項12記載のDNA。

【化1】



図中の略号は以下を示す。Bm:BamHI, Pt:PstI, S1:Sall, Sp:SpeI, Sh:SphI, Xb:XbaI

【請求項14】 プラスミドKNYES に組み込まれ、酵母にビール酵母型凝集性を付与する活性を有する蛋白をコードする塩基配列を含むDNA。

【請求項15】 請求項5ないし14のいずれかに記載のDNA を含むプラスミド。

【請求項16】 請求項5ないし14のいずれかに記載のDNA を導入することを特徴とする、ビール酵母型凝集性が付与または強化された酵母の製造方法。

【請求項17】 請求項5ないし14のいずれかに記載のDNA を破壊することによって、ビール酵母型凝集性を付与する活性を持つ蛋白を発現させる能力を欠失または減少させたDNA を導入することを特徴とする、ビール酵母型凝集性が欠失または減少した酵母の製造方法。

【請求項18】 請求項5ないし14のいずれかに記載のDNA の発現を抑制することによって、酵母のビール酵母型凝集性を欠失または減少させる方法。

【請求項19】 請求項16ないし17のいずれかに記載の方法で製造された酵母。

【請求項20】 請求項19に記載の酵母を培養すること

を含む醸造製品の製造法。

【請求項21】 請求項20に記載の方法で製造された醸造製品。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、酵母凝集遺伝子およびその利用に関し、さらに詳細には、酵母にビール酵母型凝集性を付与する活性を有する蛋白、前記蛋白をコードするDNA、前記DNA を含むプラスミド、前記DNA を利用して、ビール酵母型凝集性を付与または強化された酵母を製造する方法およびビール酵母型凝集性が欠失または減少した酵母を製造する方法、並びに、前記DNA の発現を抑制することによって、酵母のビール酵母型凝集性を欠失または減少させる方法に関する。

【0002】 本発明はまた、前記方法によりビール酵母型凝集性が付与または強化または欠失または減少した酵母に関する、さらに、本発明は、前記の酵母を培養することを含む醸造製品の製造法、ならびに当該製造法により得られる醸造製品に関する。

(3)

特開平 8-266287

3

【0003】

【従来の技術】ビール、ワイン等の酒類において、その醸造に供される酵母の凝集性はその製品の香味を左右するばかりでなく、醸造工程の作業上からも重要であることは周知の事実である。ドイツを中心に日本、その他の各国で広く製造されているラガータイプのビールの製造に使用される酵母は、発酵が終了に近づくとき酵母が凝集して発酵液の底に沈降する特性を持ち、特に下面酵母と呼ばれている。ビール醸造では、発酵が終了して沈降した酵母を回収して、さらに次の発酵に繰り返して使用するという、他の醸造では見られない製造上の特徴があるために、下面酵母のこの発酵後期に沈降する性質は、ビール醸造にとって特に大きな意味を持つ。

【0004】ビール酵母は製品ビールの香味等を決定する大きな要因の一つであるため、優秀な酵母を育種することはビール生産者の重要な課題となっている。その下面酵母の育種において、適切な凝集性を持たせることは重要な意味がある。なぜならば、凝集性が強すぎる酵母は発酵途中に発酵液中で沈降してしまい、それ以降の発酵が進まず、逆に、凝集性が無い酵母は発酵後期になっても浮遊したままで、酵母をビールから取り除くために遠心分離などの操作が必要になる。したがって、発酵の初期には発酵液中に分散して、しかも発酵後期には凝集性が強くなって良く沈降する酵母が現在の製造法には相応しい酵母である。製造法が異なれば、それに適した凝集性を持つ酵母が必要なのは言うまでもない。

【0005】これらの産業上重要な性質である酵母の凝集性に関する膨大な研究にもかかわらず、酵母凝集の機構は未だ明らかにされておらず、酵母自体の改良による凝集性の制御は成功しているとは言い難い。長年に渡る酵母の遺伝子レベルの研究から、酵母の凝集性に関与する遺伝子として、FL01、flo3、FL05、FL08、sfl1、fsu1、fsu2、tup1、cyc8、cka2、FMC1などの遺伝子、およびミトコンドリアDNA中のoli1、oxi2遺伝子の存在がこれまでに確認されてきた。これらの酵母の凝集性に関与する遺伝子の分子レベルの研究としては、FL01遺伝子の単離とその解析がなされている(YEAST, 9, 423 (1993) およびYEAST, 10, 211 (1994))。また、FL05遺伝子の単離とその解析についても報告されており、そこでは、FL05遺伝子はこれまで報告されているFL01遺伝子と酵母染色体DNA上で存在位置が異なるものの、制限地図およびDNA塩基配列がほぼ同等であることが示されている[J. Inst. Brew., 85, 95, (1979) およびCurr. Genet., 25, 196 (1994)]。

【0006】しかしながら、これらの遺伝子の分子レベルでの解析は十分なものではなく、これらの遺伝子が酵母の凝集にどのようなメカニズムで関与しているのかは明らかにされていない。また、FL01およびFL05遺伝子以外の酵母の凝集性に関与する遺伝子については、単離やその構造解析すら行われておらず、これらの遺伝子がコ

4

ードしている蛋白についても全く報告されていない。

【0007】上記のような酵母の凝集性に関与する遺伝子を利用して、酵母の凝集性を改良する試みとしては、サッカロマイセス・セレビシエの凝集遺伝子であるFL01遺伝子の導入によって、ビール酵母を含む各種非凝集性酵母へ凝集性を付与するという報告がある[Agric. Bio 1. Chem., 55, 1547 (1991)]。しかしながら、このようにして取得された形質転換体であるビール酵母の凝集性は発酵の初期から発現し、発酵が遅れ気味になることが報告されている[醸造協会誌 88, 665 (1993)]。したがって、このFL01遺伝子による酵母への凝集性付与は好ましい様式で制御されているとはいえず、実用化のためには更なる改良が必要であった。さらに、FL01遺伝子は酵母に凝集性を付与することができることは知られていたが、その遺伝子産物の酵母凝集における役割は、解明されていない。FL01遺伝子のDNA塩基配列から推定されるアミノ酸配列の解析より、FL01遺伝子産物は酵母細胞表面に局在すると推定されていた。このことは、凝集性ビール酵母特異的に酵母細胞表面から取得される蛋白(flocculin)のN末端の14残基のアミノ酸配列が、FL01遺伝子のDNA塩基配列から推定されるアミノ酸配列と同一性が有るという報告[Appl. Environ. Microbiol., 60, 2754 (1994)]からも支持されると考えられるが、この蛋白の機能解明には至っていない。また、凝集性酵母特異的な酵母細胞表面蛋白は他にも幾つか知られているが、いずれもその役割は解明されていない。このため、FL01遺伝子を変換することによって、酵母凝集を制御するという試みは、行き詰まっていた。

【0008】FL01遺伝子以外の遺伝子を利用する試みとしては、細胞融合法を用いたFL05遺伝子による酵母への遺伝形質の付与が試みられ、その遺伝形質付与の有用性が示された[J. Inst. Brew., 98, 315 (1992)]。しかしながら、遺伝形質導入法が細胞融合法であるために、目的とする形質をもつ酵母を取得するのが困難であるばかりでなく、取得された酵母には目的とする凝集関連遺伝子以外のDNA配列も導入されてしまい、たとえば、多くのサッカロマイセス・セレビシエのもつ、ビールにフェノール臭を付加するPOF1遺伝子も同時に導入される[Proc. Eur. Brew. Conv. 497 (1981)]という問題を生じていた。すなわち、本方法による実用酵母の凝集性の改良は、制御されているものとはいえず、以上のように、これまで試みられてきた酵母の凝集に関与する遺伝子を用いる酵母の凝集性の改良は、実用に耐えうるものではなかった。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】したがって、本発明は、以下の各事項：

(1) 酵母にビール酵母型凝集性を付与する活性を有する蛋白を提供すること；

(2) 酵母にビール酵母型凝集性を付与する活性を有す

(4)

特開平 8-266287

5

る蛋白をコードする遺伝子DNA を提供すること；

【0010】(3) 上記の遺伝子DNA を利用して、ビール酵母型凝集性が付与または強化された酵母、あるいはビール酵母型凝集性が欠失または減少した酵母の製造方法、ならびに該方法によりビール酵母型凝集性が付与または強化または欠失または減少した酵母を提供すること；

(4) 上記の遺伝子DNA の発現を抑制することによって、酵母のビール酵母型凝集性を欠失または減少させる方法を提供すること、ならびに

(5) 上記の酵母を培養することを含む醸造製品の製造法ならびに該製造法により得られた醸造製品を提供することも目的とする。

【0011】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記の各課題を解決すべく、下面ビール酵母の凝集性に関して鋭意研究した結果、凝集性下面ビール酵母が特異的に持つFL01相同遺伝子（以下、Lg-FL01 遺伝子）の存在と、Lg-FL01 遺伝子と凝集性の関係を明かにし、次いで、このLg-FL01 遺伝子を導入することによってLg-FL01 遺伝子産物をFL01遺伝子が破壊されて非凝集性になっている酵母内で生成せしめたところ、ビール酵母型の酵母凝集が引き起こされることを見出した。これは、ビール酵母型凝集性の付与のみならず、実験酵母型凝集性を持つ酵母のビール酵母型凝集性への転換も意味する。さらに、当該遺伝子産物における下面ビール酵母型の酵母凝集を決定している領域を決定した。また、本発明者らは、Lg-FL01 遺伝子を破壊したものを凝集性の下面ビール酵母に導入することにより、その酵母を非凝集性に転換させることに成功して、本発明を完成させるに至った。

【0012】すなわち、本発明は、実質的に配列表の配列番号1に示したアミノ酸配列を有するLg-FL01 遺伝子産物、あるいは、実質的に配列表の配列番号1に示したアミノ酸配列を有するペプチドを含み、酵母にビール酵母型凝集性を付与する活性を有する蛋白、あるいは実質的に配列表の配列番号1に示したアミノ酸配列のうち、少なくとも25番目のアミノ酸残基から213 番目のアミノ酸残基を含むアミノ酸配列を有するポリペプチドを含み、酵母にビール酵母型凝集性を付与する活性を有する蛋白、あるいは実質的に配列表の配列番号1に示したアミノ酸配列のうち、少なくとも25番目のアミノ酸残基から97番目のアミノ酸残基を含むアミノ酸配列を有するポリペプチドを含み、酵母にビール酵母型凝集性を付与する活性を有する蛋白、あるいは、酵母にビール酵母型凝集性を付与する活性を有し、実質的に配列表の配列番号2に示したアミノ酸配列を有するポリペプチドを提供する。尚、「実質的に」とは、酵母にビール酵母型凝集性を付与する活性を有する限りアミノ酸配列の一部にアミノ酸の幾つかについて欠失、置換、付加、重合などを許容することを意味するものである。

6

【0013】また、本発明は、実質的に配列表の配列番号1に示したアミノ酸配列をコードする塩基配列を含む遺伝子DNA、あるいは実質的に配列表の配列番号1に示したアミノ酸配列のうち、25番目のアミノ酸残基から213 番目のアミノ酸残基を含むアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする塩基配列を含むDNA、あるいは実質的に配列表の配列番号1に示したアミノ酸配列のうち、少なくとも25番目のアミノ酸残基から97番目のアミノ酸残基を含むアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする塩基配列を含むDNA を提供する。尚、「実質的に」とは、酵母にビール酵母型凝集性を付与する活性を有する限りアミノ酸配列の一部にアミノ酸の幾つかについて欠失、置換、付加、重合などを許容することを意味するものである。

【0014】さらに、本発明は、酵母にビール酵母型凝集性を付与する活性を有するアミノ酸配列をコードする塩基配列を含み、配列表の配列番号3に示した塩基配列のうち59番目の塩基から697 番目の塩基までの配列を含むDNA またはその相補鎖であるDNA、あるいは酵母にビール酵母型凝集性を付与する活性を有する蛋白をコードする塩基配列を含み、配列表の配列番号3に示した塩基配列のうち、131 番目の塩基から697 番目の塩基を含むDNA またはその相補鎖、あるいは配列表の配列番号3に示した塩基配列のうち、131 番目の塩基から349 番目の塩基を含むDNA またはその相補鎖、さらには、配列表の配列番号4に示した塩基配列を含み、酵母にビール酵母型凝集性を付与する活性を有するポリペプチドをコードするDNA またはその相補鎖を提供する。

【0015】本発明はまた、プラスミドKTYT2、YESKT2、KNWC3またはKNYES に組み込まれ、酵母にビール酵母型凝集性を付与する活性を有する蛋白をコードする塩基配列を含むDNA、ならびに前記のDNA を含むプラスミドを提供する。本発明はまた、前記のDNA を導入することを特徴とする、ビール酵母型凝集性が付与または強化された酵母の製造方法、ならびに前記のDNA を破壊することによって、ビール酵母型凝集性を付与する活性を持つ蛋白を発現させる能力を欠失または減少させたDNA を導入することを特徴とする、ビール酵母型凝集性が欠失または減少した酵母の製造方法を提供する。

【0016】さらに、本発明は、前記いずれかの方法により製造されたビール酵母型凝集性が付与または強化または欠失または減少した酵母を提供する。本発明はまた、前記のDNA の発現を抑制することによって、酵母のビール酵母型凝集性を欠失または減少させる方法も提供する。さらに、本発明は、前記の酵母を培養することを含む醸造製品の製造法、およびその醸造製品を提供する。

【0017】以下、本発明を詳細に説明する。なお、本明細書では、「DNA」、「塩基配列」、「遺伝子」および「遺伝子DNA」という用語を実質的に同義のものとし

10

20

30

40

50

(5)

特開平 8-266287

7

て用いることとする。また、本明細書では、「アミノ酸配列」、「ペプチド」、および「蛋白」という用語を実質的に同義のものとして用いることとする。

【0018】〈酵母細胞間凝集〉酵母細胞間の凝集は、 $\alpha$ 型細胞と $\alpha$ 型細胞間の性的凝集、出芽娘細胞の母細胞からの未分離、非性的凝集などに起因することが知られているが、本発明は、これらのうちの非性的凝集の制御を目的とする。非性的凝集の機構を説明するモデルとしては、凝集性酵母の細胞表面にあるレクチン様蛋白と糖鎖の結合で隣り合う酵母が結合しているとするレクチン仮説[J. Bacteriol., 150, 878 (1982)]が有力であるが、レクチン様蛋白の同定は成されていない。このことが、酵母凝集の制御が未だ困難である要因でもある。非性的凝集は、それを阻害する糖の種類によって、マンノース特異的なFlo1タイプと、マンノースの他にマルトースやグルコース等によっても阻害されるNewFloタイプの、大きく2つに分類できることが報告されている[YEA ST, 7, 559 (1991)]。本発明者らは、一般的な下面ビール酵母の凝集性はNewFloタイプに属することを発見した。本明細書では、理解を容易にするため、これらのタイプの凝集性を以下のような用語で示す。

【0019】すなわち、一般的な実験酵母が示す凝集性である、共存するマンノースにより阻害されるが、マルトース、グルコースなどでは阻害されない凝集性を、本明細書では「実験酵母型凝集性」という用語で示す。また、一般的な下面ビール酵母に代表される酵母が示す凝集性である、共存するマンノースの他にマルトース、グルコース等によっても阻害される凝集性を、「ビール酵母型凝集性」という用語で示す。両タイプの凝集性は共にガラクトースでは、凝集が阻害されない。本発明者らは、下面ビール酵母が「ビール酵母型凝集性」という性質を持つことは、以下の理由から、少なくともビール製造において、非常に重要であると推察する。すなわち、この「ビール酵母型凝集性」が、実験酵母の持つ凝集性と大きく異なるのは、グルコース、マルトースなどでも阻害されることである。ビールは、麦汁をビール酵母で発酵して製造されるものであるが、この麦汁中には、約6%のマルトースおよび約1%のグルコースが含まれていることから、これらの糖によって凝集阻害がかかるということは、重要な意義を持つ。言い換えれば、この「ビール酵母型凝集性」の性質のために、麦汁に添加されたビール酵母は、麦汁中の糖類により凝集が阻害され、麦汁中に分散できるため、発酵が速やかに進行する、そして、発酵後期に発酵液中の糖濃度が低くなると、凝集阻害が弱くなって、酵母は凝集塊となり沈降するために、酵母回収が容易になると推察できる。

【0020】〈Lg-Flo1蛋白〉Lg-Flo1蛋白は、本来、ビール酵母型凝集性を示す下面ビール酵母およびその減数体の特徴的なFLO1相同遺伝子、すなわち、Lg-FLO1遺伝子がコードする蛋白である。本発明はLg-Flo1蛋白お

8

よび誘導体を包含する。Lg-Flo1蛋白は、酵母、特にサッカロマイセス・セレビシエ(Saccharomyces cerevisiae)から誘導されるものであり、酵母にビール酵母型凝集性を付与できる性質を有する。Lg-Flo1蛋白は、実質的に配列表の配列番号1に示したアミノ酸配列をそのアミノ酸配列中に含む。「実質的に配列表の配列番号1に示したアミノ酸配列」とは、「配列表の配列番号1に示したアミノ酸配列」に加えて、酵母にビール酵母型凝集性を付与する限りにおいて、配列表の配列番号1に示したアミノ酸配列が改変されたアミノ酸配列、すなわち配列表の配列番号1に示したアミノ酸配列の一部にアミノ酸が付加、挿入、欠失または置換されたアミノ酸配列を含むものである。

【0021】本発明の「配列表の配列番号1に示したアミノ酸配列」は、公知の実験酵母FLO1遺伝子の塩基配列から推定されるアミノ酸配列と相同性がある。しかしながら、両者の決定的な違いは、本発明の「配列表の配列番号1に示したアミノ酸配列」を含むLg-Flo1蛋白およびその誘導体は、前述したビール酵母にとって重要な性質である「ビール酵母型凝集性」を酵母に付与できることである。本発明が完成して初めて、Lg-Flo1蛋白およびその誘導体が、「ビール酵母型凝集性」を酵母に付与できることが示された。

【0022】凝集性ビール酵母の細胞表面から取得された蛋白であるflocculinはその生物学的機能については解明されていないが、N末端の16残基のアミノ酸配列が決定されている(\*TQACLPLVG\*RKNGHN:\*は同定出来なかったアミノ酸残基[Appl. Environ., Microbiol., 60, 2754 (1994)]。本発明により、初めて機能が解明されたLg-Flo1蛋白は、この配列を含んでいる(配列表の配列番号1の25番目から40番目)。本発明のLg-Flo1蛋白とflocculinが同一であるという証拠は現時点ではない。しかしながら、本発明のLg-Flo1蛋白でも、配列表の配列番号1の1番目から24番目のアミノ酸配列の相当する領域は、Lg-Flo1蛋白が細胞表面に局在するために必要な分泌シグナル配列である可能性は極めて高い。すなわち、凝集性酵母の細胞表面に局在し、酵母に凝集性を付与する活性をもつ蛋白は、配列表の配列番号1の25番目以降のアミノ酸配列をもつ蛋白であると推察される。

【0023】〈Lg-FLO1遺伝子〉本発明はLg-FLO1遺伝子DNAを包含する。ここで、「Lg-FLO1遺伝子DNA」とは、酵母にビール酵母型凝集性を付与する活性を持つLg-Flo1蛋白およびその誘導体をコードする塩基配列を含むDNAをいうものとする。具体的には、本発明は、実質的に配列表の配列番号1に示したアミノ酸配列を有する蛋白をコードする塩基配列を含む遺伝子DNAを包含する。なお、ここでいう「アミノ酸配列を有する蛋白をコードする塩基配列」とは、縮重関係にある全ての塩基配列を意味している。

【0024】本発明を完成するために不可欠であったの

(5)

特開平 8-266287

9

は、実施例1に記載した、ビール酵母型凝集性を示す下面ビール酵母およびその減数体は、特徴的なFL01相同遺伝子を持っていることの発見であった。明細書中では、この「ビール酵母型凝集性を示す下面ビール酵母およびその減数体に特徴的なFL01相同遺伝子」を「Lg-FL01遺伝子」という用語で示している。しかしながら、この発見だけでは、「Lg-FL01 遺伝子」が「ビール酵母型凝集性」を付与する活性を持つことには、全く繋がらない。本発明完成には、更なる工夫が必要であった。また別の見地からすると、本発明は、プラスミドKTMT2 に組み込まれ、酵母にビール酵母型凝集性を付与する活性を有する蛋白をコードする塩基配列を含むDNA も包含する。

【0025】以上に記載した本発明のDNA を総称して、以下、「Lg-FL01 遺伝子DNA」ということとする。本発明のLg-FL01 遺伝子DNA は、天然物由来のものでも、全合成したものでも、あるいは天然物由来のものの一部を利用して合成を行ったもの、すなわち半合成のものでもよい。

【0026】〈形質転換〉本発明のLg-FL01 遺伝子DNA を導入することにより、ビール酵母型凝集性が付与あるいは強化された酵母を得ることができる。Lg-FL01 遺伝子DNA を導入する方法としては、遺伝子工学の分野において慣用されているものを用いればよく、それを慣用基準 [ANALYTICAL BIOCHEMISTRY 163, 39: (1987)等] に準じて実施すればよい。具体的には、所望のDNA をベクターに組み込んでこれを酵母に導入する方法、ベクターに組み込まずに直接酵母に導入する方法などを挙げることができる。

【0027】上記のDNA をベクターに組み込んでこれを酵母に導入する方法において、使用可能なベクターとしては、たとえば、YRp 系（酵母染色体のARS 配列を複製起点とする酵母用マルチコピーベクター）、YEpl 系（酵母の2μm DNA の複製起点を持つ酵母用マルチコピーベクター）、YCp 系（酵母染色体のARS 配列を複製起点として持ち、かつ酵母染色体のセントロメアのDNA 配列を持つ酵母用シングルコピーベクター）、YIp 系（酵母の複製起点を持たない酵母染色体組み込み用ベクター）等、知られているもの全てのものを用いることができる。これらのベクターは文献に記載されており [医学出版センター刊、「酵母のニューバイオテクノロジー」、p.284]、容易に作製することができる。

【0028】ベクターに組み込まずに直接酵母にDNA を導入する手法の代表的なものとしては、薬剤耐性遺伝子等のマーカー遺伝子を持つプラスミドと導入するDNA 配列とで同時に酵母を形質転換する共形質転換法をあげることができる（特公平5-60918 号公報）。上記のような方法において、導入した遺伝子DNA を酵母中で発現させるために、あるいは発現を増加もしくは減少させるためには、転写および翻訳を制御するユニットであるプロモーターを本発明DNA 鎖の5'-上流域に、ターミネータ

10

ーを3'-下流域にそれぞれ組み込めば良い。このプロモーターおよびターミネーターとしては、Lg-FL01 遺伝子それ自身に由来するものの他、アルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子 [J. Biol. Chem., 257, 3018 (1982)]、ホスホグリセレートキナーゼ遺伝子 [Nucleic Acids Res., 10, 7791 (1982)]、グリセロールアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子 [J. Biol. Chem., 254, 9839 (1979)]等既に知られている遺伝子由来のもの、もしくは、人工的にそれを改良したものの使用が可能である。より具体的には、ADH（別名ADC）、CAPDH（別名GPD）、PHO、GAL、PGK、ENO、TRP、HIP等のプロモーターやターミネーターを使用することができる。

【0029】さらに、適当なプロモーターを選択することにより、本発明DNA 鎖の遺伝子を酵母中で制御して発現させることも可能である。例えば、ガラクトキナーゼ遺伝子のプロモーターを使用すれば、培地の糖源をたとえばグルコースからガラクトースに変えることにより発現を増加させることができる。また、本発明のLg-FL01 遺伝子DNA を破壊することによって、Lg-Flol 蛋白を発現させる能力を欠失または減少させたDNA を導入することにより、凝集性が欠失または減少した酵母を得ることができる。Lg-FL01 遺伝子DNA の破壊は、Lg-FL01 遺伝子のLg-Flol 蛋白発現に関与する領域、たとえば、プロモーター領域やコード領域の内部へ単一あるいは複数の塩基を付加あるいは欠失させたり、これらの領域全体を欠失させることにより行うことができる。このようにしてLg-FL01 遺伝子を破壊することによって、Lg-Flol 蛋白を発現させる能力を欠失または減少させたDNA は、上記したDNA 導入法と同じ手法で酵母に導入することができる。その導入によって、宿主酵母の染色体DNA 中のLg-FL01 遺伝子と導入したDNA との間で相同組換えが起こり、宿主酵母のLg-FL01 遺伝子が分断されてLg-Flol 1 蛋白を発現する能力が欠失または減少し、その結果、宿主酵母の凝集性が欠失または減少すると考えられる。

【0030】本発明において形質転換すべき酵母、すなわち宿主酵母、は分類学上、酵母の範囲に入りうる任意のものでありうるが、本発明の目的からすれば、サッカロマイセス・セレビシエに属する酒類製造用酵母、具体的にはビール酵母、ワイン酵母等、あるいは、アルコール製造に用いられる酵母等が好ましい。本発明は、上記のLg-FL01 遺伝子DNA の発現を抑制することによって、酵母の凝集性を欠失または減少させる方法をも包含する。このような方法の例としては、Lg-FL01 遺伝子DNA を破壊することによって、Lg-Flol 蛋白を発現させる能力を欠失または減少させたDNA を導入する方法、アンチセンスRNA法等を挙げることができる。

【0031】本発明は、実施例1(6)に示したような、上記のLg-FL01 遺伝子DNA を実験酵母型のFL01遺伝子などと入れ替えることによる、実験酵母型凝集性をビ



(7)

特開平 8-266287

11

ール酵母型凝集性に転換する方法をも包含する。また、この逆の転換も本発明により提供されたLg-FL01 遺伝子DNAにより可能である。本発明の酵母を培養することを含み醸造製品は、ビール、清酒、焼酎、ワイン、ウイスキー、ブランデーを含むアルコール飲料、また醤油、味噌、みりんなどの調味料、さらには、燃料用アルコールなどを包含する。本発明における醸造製品の製造法としては、前記醸造製品に係わる醸造過程を包含する。

【0032】

【発明の効果】本発明によれば、酵母にビール酵母型凝集性を付与する活性を有するLg-Flol蛋白、ならび該蛋白をコードするLg-FL01 遺伝子DNA が提供される。本発明のDNA を外来遺伝子として遺伝子工学的手法によって酵母に導入すること、即ち、このDNA を核外および（または）核内遺伝子として酵母細胞内に導入することによって、酵母にビール酵母型凝集性を付与したり、酵母のビール酵母型凝集性を強化することができる。また逆に、このDNA を破壊したものを酵母細胞内に導入したり、このDNA の発現を抑制することにより、凝集性の酵母を非凝集性に転換したり、凝集性を減少させることができる。

【0033】

\*

【表1】

凝集測定用培地

ガラクトース	50 g/l
YNB w/o AA & AS *	1.7 g/l
アミノ酸	
アスパラギン酸	100 mg/l
グルタミン酸	100 mg/l
スレオニン	100 mg/l
セリン	100 mg/l
リジン塩酸塩	100 mg/l
アルギニン	100 mg/l

\*: アミノ酸および硫酸アンモニウムを含まないイースト・ナイトロジェン・ベース形質転換体の培養に際してはこの組成の培地に、硫酸アデニン、トリプトファン、ヒスチジン塩酸塩をそれぞれ20mg/lとなるように添加した培地を用いた。

【0035】これらの株から、以下に述べるようにサザン解析およびノザン解析を行なった。全DNAの抽出は、YPD培地（2% バクトペプトン（ディフコ社）、1% 酵母抽出物（ディフコ社）、2% グルコース）で30℃で振とう培養し、静止期に達した細胞から、Herefordらの方法 [Cell, 18, 1261-1271, (1979)] によって実施した。抽出されたDNAは2 μg相当をBindIII（ペーリンガー社）で消化し、1%アガロースゲルを用いて電気泳動後、ナイロンフィルターHybond N+（アマシャム社）に、そのプロトコールに従ってブロッティングを行ない、その後のサザン解析に供試した。また、全RNAの抽出は、これらの

12

\* 【実施例】

【実施例1】 ビール酵母型凝集に深く関与するFL01相同遺伝子のクローニング

(1) ビール酵母の凝集性に関与する遺伝子の探索  
ビール酵母の凝集性に関与する遺伝子を探索する目的で、以下の実験を実施した。凝集性ビール酵母、KI084株から、Stewartの方法 [J.Inst.Brew., 93, 216-219, (1987)] によって胞子を形成させ、染色体数の減少した株（以降、このような株を減数体と呼ぶ）を作成した。得られた減数体の内、6株に関して、表1に記載した培地を用いて20℃で静置条件下で48時間培養した。培養後の細胞は遠心にて集菌し、0.1M EDTAで2回洗浄後、滅菌水で2回洗浄し、滅菌水に再懸濁した。この細胞の凝集性判定を以下の方法によって行なった。すなわち、最終OD600=2.0となるように、凝集測定用緩衝液（50mM 酢酸ナトリウム、0.1% 塩化カルシウム、pH4.6）に懸濁し、室温で30分間置いた後、20秒間激しく攪拌し、さらに5分間静置した後、目視によって凝集、非凝集の別を判定した。この結果、供試した6株の減数体は、2株の非凝集性株と4株の凝集性株に分類された。

【0034】

\*

【表1】

株に関し、表1に記載の培地を用いて48時間、20℃で静置培養を行なった細胞から、VilleneuveとMeyerの方法 [Cell, 48, 25-37 (1987)] によって実施した。得られたRNAの10 μgを、16 μlのグリオキサール・DMSO溶液 [1M グリオキサール、50% DMSO、10mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.0)] 中で、1時間、50℃の処理によってグリオキサール化を行なった後、2 μlのアプライ用緩衝液 [50% (w/v) グリセロール、10mM リン酸緩衝液 (pH7.0)、0.4% (w/v) ブロムフェニルブルー] および1 μlの1mg/ml 臭化エチジウム溶液を加え、10mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.0)、1% アガロースを含むゲル中で電

(8)

特開平 8-266287

13

電気泳動を行なった。電気泳動中は、ペリスタポンプを用いて、電気泳動層中の緩衝液を常に循環させ、pHの勾配が生ずることを防いだ。ブロムフェニルブルーがゲルの長さの70%程度まで達したときに電気泳動を中止し、紫外線トランスイルミネーターを用いて臭化エチジウムで染色されたゲル中のRNAを観察し、リボソーマルRNAを指標にRNAが分解されていないことを確認した。その後、ゲル中のRNAを、その添付されたプロトコールに従って、ナイロンフィルターGenescreen-Plus (デュボン社)にプロットングし、RNAがプロットングされたフィルターに対し、80°C、2時間の処理を行なった。このフィルターは、Genescreen-Plusに添付されたプロトコールに従ってノザン解析に供試した。

【0036】サザン解析およびノザン解析にプローブとして用いたFL01遺伝子の部分長のDNA断片は、以下のよう<sup>10</sup>に調製した。Teunissenら [Yeast, 9, 423-427, (1993)]の報告したFL01遺伝子の塩基配列をもとに、5' GATGAACTGTCATTGTTGTCAAA3' と5' TCGTTTCAGCAGCTAAAGTAT3' の2種のプライマーを合成した。これらのプライマーを用い、凝集性ABXL-1D株 (a, FL01, Yeast Genetic Stock Center) の全DNAを鋳型としてPCRを行ない、全PCR<sup>20</sup>産物を1%アガロースゲル中で電気泳動し、増幅された1045bpのDNA断片 (以降、FL01部分長断片と呼ぶ) をゲルから切り出し、Prep-A-Gene (バイオラッド社)を用いて回収したDNA断片を得た。この断片は、[α-32P] dCTP (アマシャム社)で標識し、プローブとして用いた。放射能の検出は、X線フィルムを用いて行なった。

【0037】結果を図1に示す。サザン解析の結果、親株KI084には、約9.5kb、5.4kb、4.3kb、3.7kbの4本のFL01<sup>30</sup>遺伝子と相同性のあるHindIII断片が検出された。KI084株に由来する減数体株では、約4.8kbと3.7kbの2本の断片に関しては供試した全ての株に見られた。また、凝集性判定試験で凝集性と判定された4株の減数体についてのみ、共通なバンドに加えて約9.5kbの断片が検出された。また、ノザン解析の結果から、親株および凝集性判定試験で凝集性と判定された4株の減数体についてのみ、FL01遺伝子の転写産物が観察された。これらの結果から、KI084に由来する減数体では、FL01遺伝子と相同な3本のHindIII断片の内、約9.5kbのHindIII断片に一部<sup>40</sup>もしくは全長が含まれるFL01相同遺伝子のみが転写され、この相同遺伝子を持つ株のみが凝集性となることが示唆された。以降、このKI084株の約9.5kbのHindIII断片に一部もしくは全長が含まれるFL01相同遺伝子を、Lg-FL01 (Lager Type-FL01)と呼ぶ。

【0038】(2) Lg-FL01遺伝子の制限酵素地図の作成

KI084株に由来する減数体の内、凝集性のKMS004株および、非凝集性のKMS001株の各1株ずつを選び、前述の方法でDNAを調製し、数種類の制限酵素 (ベーリンガー社)を単独で、もしくは2種の酵素を組み合わせて用

14

い、前述のFL01部分長断片をプローブとしたサザン解析を実施した。その結果、凝集性のKMS004株には常に、非凝集性の減数体と共通な2本のバンドの他に、非凝集性の減数体には観察されない1本のバンドが検出された。この凝集性減数体に特異的なバンドにLg-FL01遺伝子の一部、もしくは全長が含まれると考えられ、この断片の長さを測定し、図2に示すような制限酵素地図を作成した。

【0039】(3) Lg-FL01遺伝子の部分長を含むKpnI断片のクローニング

図2に示した制限酵素地図をもとに、約5.6kbのKpnI断片のクローニングを試みた。KI084株に由来する凝集性の減数体KMS004株のDNAをKpnI (ベーリンガー社)で完全消化後、0.8%アガロース電気泳動法により分画し、約5.6kbに相当するDNA断片ミックスをゲルより切り出し、透析チューブ中で電気溶出することにより精製した。前述のFL01遺伝子の部分長をプローブとしたサザン解析により、精製したDNA断片ミックス中に、目的のDNA断片が含まれているのを確認した後に、KpnIで完全消化したプラスミドpUC18 (宝酒造)と精製DNA断片ミックスをDNA<sup>20</sup>ライゲーションキット (宝酒造)を用いて連結し、大腸菌DH5α (BRL社)を形質転換した。得られた形質転換体のうち、5000株について、ナイロンフィルターHybondN+ (アマシャム社)に添付プロトコールに従ってプロットングし、前述のFL01部分長断片をプローブとしたコロニーハイブリダイゼーションを実施し、10株の陽性株を取得した。これらの陽性株からアルカリ法によってプラスミドを調製し、制限酵素解析を行なった結果、これらの株がもつプラスミドは同一の挿入断片を持っていることが確認できた。その中の1株のプラスミド、pKF-Kpn11の挿入断片について、凝集性減数体KMS004株と非凝集性<sup>30</sup>減数体KMS001株のDNAをコントロールとするサザン解析をした結果、挿入断片は目的のLg-FL01遺伝子の一部であることが確認できた。

【0040】(4) Lg-FL01遺伝子の部分長を含むKpnI断片の一部の塩基配列決定

pKF-Kpn11の挿入断片の塩基配列を決定するために、キ<sup>40</sup>ロシーケンス用 デレーションキット (宝酒造)を用い、添付プロトコールに従ってpKF-Kpn11の挿入断片のデレーションシリーズを作成した。塩基配列の決定は、PCR/Sequencing キット (パーキン・エルマー社)を用い、DNAシーケンサ (パーキン・エルマー社)によって行なった。塩基配列の解析は、DNASIS (日立ソフトウェアエンジニアリング社)によって行なった。既知のFL01遺伝子のコード領域の塩基配列と相同なコード領域が見出されたKpnI部位からHindIII部位までの2.9kbの塩基配列を両方向から決定した。決定された塩基配列中には、Lg-FL01遺伝子のコード領域の途中から、終止コドンに至る2.5kbのORFが存在していた。

50 【0041】(5) inverse-PCRによるLg-FL01遺伝子の

(9)

特開平 8-266287

15

## 全長の取得

inverse-PCRによるLg-FL01遺伝子の全長の取得を模式的に図3に示す。先に決定したLg-FL01遺伝子の部分長【図3 (1)】の塩基配列より、primer5 [5' AATACACAACATGGTGTCT3'、図3 (2)] および primer8 [5' ACCAGAGGTGGAAGTACTGG3'、図3 (3)] を合成した。凝集性減数体KMS004株のDNA 60  $\mu$ g を300ユニットのHindIII (ペーリンガー社) で消化し、エタノール沈殿で回収後、30  $\mu$ l のTE緩衝液に溶解し、300  $\mu$ l のスケールでDNAライゲーションキット (宝酒造) を用いてDNA断片の自己閉環化を行なった。その結果反応物中に、図3中の(4)および(5)に示されたHindIII部位が連結した環状分子が存在していることが期待される。この反応生成物をエタノール沈殿で回収し、その4  $\mu$ g相当を鋳型として、上記のprimer5 [図3 (2)] およびprimer8 [図3 (3)] をプライマーとして、LA-PCRキット (宝酒造) を用い、inverse-PCR反応を行なった。反応液の組成は添付プロトコールに従い、反応はDNAサーマルサイクラー480 (パーキン・エルマー社) を用いて、94°C1分を1サイクル後、98°C20秒、68°C10分のサイクルを30サイクル繰り返すことによって行なった。その反応生成物を0.8%アガロースを用いて電気泳動した結果、約8.2kb、約3.6kb、約3.0kbのDNA断片が増幅されているのが観察された。

【0042】この内、約8.2kbのDNA断片【図3 (6)】をゲルから切り出し、Prep-A-Gene (バイオラッド社) を用いて添付プロトコールに従ってDNA断片を精製した。この断片は図2に示された制限酵素地図中のBamHI部位、EcoRI部位、XbaI部位を有していたので、この断片中にLg-FL01遺伝子の未取得の部分が含まれていると判断した。このDNA断片を、AluI (ペーリンガー社) で消化し、pUC118 (宝酒造) のHincII部位に連結し、大腸菌DH5株 (東洋紡) に導入した。出現した形質転換体の内、30株のプラスミドを調製し、挿入断片の大きさを調べたところ、24種類に分類できたため、これらのプラスミドに関して前述の方法で挿入断片の塩基配列を決定した。その結果、既知のFL01遺伝子のアミノ基末端付近と相同性の高い断片467bpの挿入断片を持つ1クローンを得、そのプラスミドをKF1と命名した。KF1の挿入断片の染色体中の位置を図3中(7)に示す。

【0043】しかしながら、KF1の挿入断片には翻訳開始部位と思われる配列は、含まれていなかった。KF1の塩基配列をもとに、primerKN-2 [5' TTGTATCGGAGTATTATAG3'、図3 (8)] を合成した。次いで上記のinverse-PCR反応に用いた鋳型を用い、上述のprimer5 [図3 (2)] およびprimerKN-2 [図3 (8)] をプライマーとして、ジーンアンプPCRリジェントキット (宝酒造) によってinverse-PCRを行なった。反応液の組成は添付プロトコールに従い、反応はDNAサーマルサイクラー480を用いて、94°C1分、55°C2分、72°C2分のサイクルを30サイクル繰り返した後、72°C10分の反応を1サイクル行なった。そ

16

の反応生成物を0.8%アガロースを用いて電気泳動した結果、約4.4kb、約1.1kb、約0.6kbのDNA断片が増幅されているのが観察された。この内、約4.4kbのDNA断片【図3 (9)】をゲルから切り出し、上述の方法で精製し、クレノウフラグメント (宝酒造) を用いて平滑末端化し、pUC118のHincII部位に連結し、大腸菌DH5株に導入した。得られた形質転換体のプラスミド、KF14は、図2に示された制限酵素地図中のBamHI部位、EcoRI部位、XbaI部位を有していたので、この断片中にLg-FL01遺伝子の翻訳開始部位およびその5' 上流部分が含まれているものと判断された。

【0044】KF14の挿入断片中、図3 (10)に示したEcoRI部位から3' 方向の塩基配列を部分的に決定する目的で、KF14をEcoRIで消化後、自己閉環化したプラスミド、KF14 $\Delta$ Ecを構築した。このプラスミドは図3中、(10)のEcoRI部位から(8)のprimerKN-2のアニール部位までの間の断片を持つ。KF14 $\Delta$ Ecの挿入断片の塩基配列をEcoRI部位から部分的に決定した。その塩基配列をもとに、primerKT5' Ec [5' AGCGGTCGACCTAATAAGGAAAAGGGGAA3'、図3 (11)] を合成した。また、すでに決定したpKF-Kpn11の挿入断片の部分的な塩基配列をもとに、primerKT3' Hd [5' GGAAGCTTTTGTAAACAGATTTTGTCCCGCTT3'、図3 (12)] の合成を行なった。これら2種のプライマーを用いて、凝集性減数体KMS004株のDNAの2  $\mu$ g を鋳型として、LA-PCRキットを用いてPCRを行なった。反応は、94°C1分を1サイクル後、98°C20秒、68°C10分のサイクルを30サイクル繰り返すことによって行なった。その反応生成物を0.8%アガロースを用いて電気泳動した結果、約9kbの断片【図3 (13)】が増幅されているのが観察された。この断片には、図2に示された制限酵素地図中のBamHI部位およびXbaI部位が含まれていたため、この断片中にLg-FL01遺伝子の全長が含まれているものと判断された。以降、このPCRによる断片をLg-FL01遺伝子全長断片と呼ぶ。Lg-FL01遺伝子全長断片を、数種の制限酵素で消化し、0.8%アガロースゲルを用いて電気泳動を行い、制限酵素断片長を測定し、制限酵素地図を作成した。図4にLg-FL01遺伝子全長断片の制限酵素地図を示す。

【0045】(6) Lg-FL01遺伝子全長断片の酵母への導入と凝集性の性格付け

Lg-FL01遺伝子の導入による表現型の変化を調べる酵母宿主としては、以下のようにして作成したFL01遺伝子破壊株、KY644株を用いた。FL01部分長断片を、pRS405 (ストラタジーン社) のBamHI~HindIII部位に連結した。このプラスミドを、挿入断片の中にのみ一ヶ所存在するBstEII部位を切断後、凝集性酵母KY642株 (a, ura3, leu2, FL08) にリチウム法にて導入し、FL01遺伝子座の相司組換えによって非凝集性となった株を得た。この株のFL01遺伝子がpRS405の挿入によって破壊されていることを、サザン解析によって確認し、KY644株と命名し

(10)

特開平 8-266287

17

た。Lg-FL01遺伝子全長断片は、5'末端にSalI部位、3'末端にHindIII部位を持つようにデザインされたプライマーによってPCR増幅されている。この断片を、SalIおよびHindIIIで消化した。クローニングのベクターとしては、YIp5のEcoRI（ベーリンガー社）部位に、遺伝子配列のデータバンクであるアントレー（ナショナルセンターフォーバイオテクノロジーインフォメーション社）から得たCEN3の塩基配列および酵母第3染色体の全塩基配列をもとにPCRにて取得した1.2kbのCEN3を含む断片と、YRP7由来のEcoRI-HindIII断片として取得したA

10

RS配列を含む断片を導入した。pYT37を用いた。pYT37の

SalI-HindIII部位にLg-FL01遺伝子全長断片を連結し、

リチウム法によって直接、KY644株に導入した。\*

## Lg-FL01遺伝子全長断片を導入した酵母の凝集性

菌株名	KY650	KY652 (対照)
増なし	+	-
マンノース	-	-
グルコース	-	-
マルトース	-	-
ガラクトース	+	-
フラクトース	-	-

+は凝集性、-は非凝集性を示す。

【0048】KY652株ではどの条件においても凝集性を示さなかったのに対し、Lg-FL01遺伝子全長断片を含むKY650株では、糖を加えない場合に凝集測定用緩衝液中で凝集性を示した。この凝集性は、マンノース、グルコース、マルトースによって阻害され、フラクトースによってもある程度阻害されたが、ガラクトースによっては阻

30

害を受けなかった。これらのことから、Lg-FL01遺伝子全長断片を導入することによって、実験酵母にビール酵母型凝集性を付与することができると結論された。

【0049】【実施例2】Lg-FL01遺伝子のコード領域のPCRによる取得と実験酵母への導入および評価

KF14の挿入断片のベクターに連結された部分の近傍に関し、上記の方法で塩基配列の決定を行なった。その結果、KF1の挿入断片の5'上流49bpの部分にLg-FL01遺伝子の翻訳開始部位と思われる部位が存在していた。この開始コドンの5'上流58bpの位置から3'方向へのPCR用プライマー、primerKTF7（5'CCCCAAGCTTGCTCTGCAGTAAATTCGCA3'、図3（14））を合成した。また、先に決定したpKF-Kpn11の挿入断片の塩基配列をもとに、Lg-FL01遺伝子のコード領域の終始コドンの3'下流53bpの位置から5'方向へのPCR用プライマー、primerKTORFA（5'CGGAATCTCTAAACACTATAACCGTGATGATAG3'、図3（15））を、合成した。

40

これら2種のプライマーを用い、凝集性減数体KMS004株

18

\*【0046】得られた形質転換体のDNAのサザン解析を実施し、1株に関してLg-FL01遺伝子全長断片が導入されていることを確認した。この株（KY650と命名）の持つプラスミドをKTYT2と命名した。KY650株および、ベクターであるpYT37のみがKY644株に導入されている株（KY652株と命名）に関して、表1に記載した培地で20℃、振とう条件下で静止期に達するまで培養後、前述の方法で凝集性の性格付けを行なった。糖による凝集性の阻害を調べるためには、最終濃度1Mの糖を凝集測定用緩衝液に加えた。その結果を表2に示す。

【0047】

【表2】

のDNAの2μgを鋳型として、LA-PCRキットを用いてPCRを行なった。反応は、94℃30秒、60℃1分、72℃3分30秒のサイクルを30サイクル繰り返すことによって行なった。その反応生成物を0.8%アガロースを用いて電気泳動した結果、約5.8kbの断片（図3（16））が増幅されているのが観察された。以降、この断片をLg-FL01ORF断片と呼ぶ。Lg-FL01ORF断片は5'末端にHindIII部位、3'末端にEcoRI部位が存在するようにデザインされたプライマーによってPCR増幅されている。この断片を、HindIIIおよびEcoRIで消化し、酵母発現用ベクターpYES2（インビトロジェン社）のGAL1遺伝子のプロモーターの下流に正方向に挿入されるよう、HindIII-EcoRI部位に連結し、リチウム法によって直接上述のKY644株に導入した。得られた形質転換体のDNAのサザン解析を実施し、Lg-FL01ORF断片が導入されていることが確認された株の内の1株をKY646株と命名した。また、KY646株の持つプラスミドをYESKT2と命名した。KY646株と、ベクターであるpYES2のみがKY644株に導入されている株（KY649株と命名）に関して、表1に記載した培地で20℃、振とう条件下で静止期に達するまで培養後、前述の方法で、凝集性の性格付けを行なった。その結果を表3に示す。

【0050】

【表3】

GAL1プロモーターに制御されたLg-FL01ORF断片を  
導入した酵母の凝集性

置換名	KY646	KY649 (対照)
糖なし	+	-
マンノース	-	-
グルコース	-	-
マルトース	-	-
ガラクトース	+	-
フラクトース	-	-

+=凝集性、-=非凝集性を示す。

【0051】KY649株ではどの条件においても凝集性を示さなかったのに対し、Lg-FL01ORF断片を含むKY646株では、糖を加えない場合に凝集測定用緩衝液中で凝集性を示した。この凝集性は、KY650株の凝集性と同様、ビール酵母型凝集性であり、すなわち、マンノース、グルコース、マルトースによって阻害され、フラクトースによってもある程度阻害されたが、ガラクトースによって阻害を受けなかった。これらのことから、GAL1遺伝子のプロモーターの制御を受けたLg-FL01ORF断片を導入することによって、実験酵母にビール酵母型凝集性を付与することができると結論された。すなわち、Lg-FL01ORF断片中に、Lg-FL01遺伝子のコード領域が存在していると結論された。

【0052】〔実施例3〕 Lg-FL01 遺伝子中のビール酵母型凝集を支配する領域の特定  
Lg-FL01遺伝子中のビール酵母型凝集を支配する領域を特定するために、図5に示すような方法で、Lg-FL01とSc-FL01[Watariら (Yeast, 10, 211-225 (1994)) の公表した実験酵母型FL01遺伝子]のキメラ遺伝子を作成し、その凝集性を調査した。Lg-FL01ORF断片をXhoIおよびKpnIで消化し、クレノウフラグメントをもちいて末端を平滑化後、pUC118のHincII部位にクローニングした。得られた形質転換体の内、約1kbの挿入断片を持つ1クローンを選び、挿入断片の塩基配列を決定した。その結果をもとに、Lg-FL01遺伝子の開始コドンより3'下流639bp目から5'方向へのプライマー、primerKTF5 (5'CGGGATCCATCTGGCAATACCACACTAACA3')を合成した。primerKTF7およびprimerKTF8を用い、凝集性減数体KYS004株のDNAの2μgを鋳型として、LA-PCRキットを用いてPCRを行なった。反応は、94℃30秒、60℃1分、72℃3分30秒のサイクルを30サイクル繰り返すことによって行なった。その反応生成物を0.8%アガロースを用いて電気泳動した結果、約0.7kbの断片が増幅されているのが観察された。以降、この断片をLg-FL01N末断片と呼ぶ。得られた断片を、PCR産物クローニング用ベクターであるpT7Blue (ノヴァジェン社)にクローニングし、4つの独立なクローンについて、挿入断片の塩基配列を両方向から決定した。4つのクローンは全て同一の挿入断片を有してい

た。得られた塩基配列を配列表の配列番号3に示す。この中の1クローンをKNTA1と命名した。Lg-FL01N末断片は5'末端にHindIII部位、3'末端にBamHI部位が存在するようにデザインされたプライマーによってPCR増幅されている。KNTA1をHindIIIおよびBamHIで消化し、ベクターから分離された挿入断片を電気泳動後のゲルから切り出し、上述の方法で精製し、pYES2のGAL1遺伝子のプロモーターの下流に正方向に挿入されるよう、HindIII〜BamHI部位にクローニングし、得られたプラスミドをKNYESと命名した。このプラスミドKNYESを含む大腸菌(Escherichia coli) EKB707は、平成7年1月27日付けで工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託され、寄託番号FERM BP-4983が付与されている。

【0053】Watariら (Yeast, 10, 211-225 (1994))の公表した実験酵母型FL01遺伝子(以降、Sc-FL01遺伝子と呼ぶ)の塩基配列をもとに、開始コドンから3'下流721bp目より、3'方向へのプライマー、primerWtFLN (5'CGGATCCACTGTAAGTGATGACTTCGAAG3')および、終始コドンの3'下流58bp目より、5'方向へのプライマー、primerFLID4 (5'CGGAATTCCTCAGCGTATAATTAGCAAGAA3')を合成し、これら2種のプライマーを用い、ABXL-1D株のDNAの2μgを鋳型として、LA-PCRキットを用いてPCRを行なった。反応は、94℃30秒、60℃1分、72℃3分30秒のサイクルを30サイクル繰り返すことによって行なった。その反応生成物を0.8%アガロースを用いて電気泳動した結果、約3.9kbの断片が増幅されているのが観察された。以降、この断片をSc-FL01C末断片と呼ぶ。Sc-FL01C末断片は、5'末端にBamHI部位、3'末端にEcoRI部位が存在するようにデザインされたプライマーによってPCR増幅されている。この断片を、BamHIおよびEcoRIで消化し、先に構築したKNYESのLg-FL01N末断片の下流に正方向に挿入されるよう、BamHI〜EcoRI部位に連結した。この結果、Sc-FL01遺伝子のコード領域のアミノ基末端から339アミノ酸に相当する部分が、Lg-FL01遺伝子のアミノ基末端から312アミノ酸に相当する部分と置き変わった。キメラFL01タンパクをコードする遺伝子が構築されることが期待される。連結反応生成物を、リチウム法によって直接上述のKY644株に導入した。得られた形質転換体のDNA

(12)

特開平 6-266287

21

のサザン解析を実施し、Lg-FL01N末断片とSc-FL01C末断片のキメラ遺伝子が導入されていることが確認された株の内の1株をKY648株と命名した。また、この株の持つプラスミドをKNWUC3と命名した。

【0054】また、Sc-FL01遺伝子の開始コドンの5'上流-69bp目より、3'方向へのプライマー、primerFLID1 (5' CCCCCAAGCTTTTCGTTTGATGTAAGCTCTCT3') を合成した。primerFLID1およびprimerFLID4をプライマーとして用い、ABXL-1D株のDNAの2μgを鋳型として、LA-PCRキットを用いてPCRを行なった。反応は、94℃30秒 60℃1分、72℃3分30秒のサイクルを30サイクル繰り返すことにより行なった。その反応生成物を0.8%アガロースを用いて電気泳動した結果、約4.8kbの断片が増幅されているのが観察された。以降、この断片をSc-FL01ORF断片と呼ぶ。Sc-FL01ORF断片は、5'末端にHindIII部位、3'末端にEcoRI部位が存在するようにデザインされたプライマ \*

22

\*-によってPCR増幅されている。この断片を、HindIIIおよびEcoRIで消化し、pYES2のGAL1遺伝子のプロモーターの下流に正方向に挿入されるよう、HindIII～EcoRI部位に連結し、リチウム法によって直接上述のKY644株に導入した。得られた形質転換体のDNAのサザン解析を実施し、Sc-FL01ORF断片が導入されていることが確認された株の内の1株をKY647株と命名し、凝集性の比較のために用いた。また、この株の持つプラスミドをYESW1と命名した。

【0055】KY647株、KY648株および先述のKY649株に関し、表1に記載した培地で20℃、振とう条件下で静止期に達するまで培養後、前述の方法で、凝集性の性格付けを行なった。その結果を表4に示す。

【0056】

【表4】

GAL1プロモーターに制御されたLg-Sc キメラFLO1遺伝子を導入した酵母の凝集性

菌株名	KY648	KY649 (対照)	KY647 (比較)
遮なし	+	-	+
マンノース	-	-	-
グルコース	-	-	+
マルトース	-	-	+
ガラクトース	+	-	+
フラクトース	-	-	+

+は凝集性、-は非凝集性を示す。

【0057】KY649株ではどの条件においても凝集性を示さなかったのに対し、Lg-FL01N末断片とSc-FL01C末断片のキメラ遺伝子を含むKY648株および、Sc-FL01ORF断片を含むKY647株では、糖を加えない場合に凝集測定用緩衝液中で凝集性を示した。KY648株の凝集性は、KY650株と同様、マンノース、グルコース、マルトースによって阻害され、フラクトースによってもある程度阻害されたが、ガラクトースによっては阻害を受けなかった。これに対し、KY647株の凝集性は、マンノースによってのみ阻害され、グルコース、マルトース、フラクトースおよびガラクトースによっては阻害を受けなかった。すなわち、Sc-FL01ORF断片は実験酵母型凝集性を付与するのに対し、その開始コドンから3'方向へ720bp目より5'上流の部分、Lg-FL01遺伝子の開始コドンから3'方向へ639bp目までと置き換えることによって、作られたキメラ遺伝子が付与する凝集性はビール酵母型へと転換された。これらのことから、ビール酵母型凝集性の付与に深く関与しているのは、Lg-FL01ORF断片の中の、Lg-FL01N末断片、すなわち、配列表の配列番号3に示された配列であると結論された。

【0058】【実施例4】 Lg-FL01遺伝子破壊ビール酵母の評価

(1) Lg-FL01遺伝子破壊用プラスミドの作製

Lg-FL01遺伝子破壊用プラスミドは、図6、図7に示すように作製した。プラスミドpUC18をKpnIで消化後、クレノウフラグメントを用いて末端を平滑化したDNA断片をセルフライゲーションし、プラスミドpUC18ΔKを作製した。このプラスミドをHincIIで消化後、KpnIリンカー (GGGTACCC) を挿入し、プラスミドpUC18±Kを作製した。このプラスミドのEcoRI～BamHI部位間に、プラスミドpKF14から取得した0.9kbのEcoRI-BamHI断片 (5' 隣接領域を含む) を挿入し、プラスミドpKF531を作製した。

【0059】プラスミドpKF-Kpn11から取得した1.7kb HincII-PvuII断片 (3' 隣接領域を含む) をプラスミドpUC118のSnaI部位に挿入して得たプラスミドpKF3HPから、1.7kb BamHI-KpnI断片を取得し、プラスミドpKF5B1のBamHI-KpnI部位間に挿入して、プラスミドpKF53-1を作製した。酵母のGPD (グリセルアルデヒド-3-ホスフェートデヒドロゲナーゼ) 遺伝子のプロモーター領域 (1.0 kb) と酵母のPGK (ホスホグリセレートキナーゼ) 遺伝子のターミネーター領域 (0.4kb) を有するプラスミドpSY114P (特開平2-265488号公報) をSnaI消化後、HindIIIリンカー (CAAGCTTG) を連結し、HindIII消化後セルフライゲーションしてプラスミドpSY114Hを作製した。このプラスミドのHindIII部位に、プラスミドpSV2bsr (フナコ

(13)

特開平 8-266287

23

シ)の0.5kb HindIII断片を挿入し、プラスミドpGPDBSRを作製した。このプラスミドをSalIで消化後、クレノウフラグメントで末端を平滑化し、1.9kbのDNA断片を取得した。このDNA断片と、プラスミドpKF53-1を3amHI消化後、クレノウフラグメントで末端を平滑化したDNA断片を連結し、プラスミドpKF53BSR19を作製した。

#### 【0060】(2) ビール酵母の形質転換

ビール酵母の形質転換は、電気パルス法を用いた。200mlのYPD培地でOD600が約7になるまで培養した凝集性ビール酵母を、無菌水で2回、1Mソルビトールで2回洗浄後、1mlの1Mソルビトールに再懸濁した。このうちの50μlの酵母懸濁液に、プラスミドpKF53BSRをEcoRIで消化したDNA断片2.7μgと10μgのサケ精子DNA(シグマ)を加え、5分放置後、ジーンバルサー(バイオラッド社)の0.2cmセルを用いて、1.5KV、25μF、200Ωの電気パルスかけた。この懸濁液に、1mlの1mソルビトールと400μlのYPDを加え、30℃で4時間振盪培養した後、50μg/mlのブラストサイジンS(フナコシ)を含むYPD寒天培地に塗布し、30℃で3日間培養した。出現した形質転換体について、サザン解析を実施し、Lg-FL01遺伝子が破壊されていることを確認した。このようにして得られたLg-FL01遺伝子が破壊されたビール酵母の凝集性を評価したところ、非凝集性へと転換していた。

【0061】【実施例5】 Lg-FL01 遺伝子とSc-FL01 遺伝子のN末端領域の推測されるアミノ酸配列の比較  
実施例3によって、Lg-FL01 遺伝子のN末端領域213アミノ酸の配列によって、ビール酵母型凝集性は支配されていることが示された。そこで、Lg-FL01 遺伝子とSc-FL01 遺伝子のこの部分の推測されるアミノ酸配列を比較した。その結果、図8に示す通り、以下の特徴的な差異が両者の間に観察された。1) Lg-FL01遺伝子では、Sc-FL01 遺伝子の84番目のアミノ酸から110番目のアミノ酸に相当する27アミノ酸が欠失している。2) Sc-FL01遺伝子で数えて123番目のアミノ酸までは、Sc-FL01 遺伝子とLg-FL01 遺伝子の相同性は比較的低い。3) Sc-FL01遺伝子で数えて124番目のアミノ酸以降は、Sc-FL01 遺伝子とLg-FL01 遺伝子の相同性は高い。

【0062】これらの結果を踏まえて、Sc-FL01 とLg-F×配列

24

\*L01 のキメラ遺伝子及び、Sc-FL01の84番目のアミノ酸から110番目のアミノ酸に相当する27アミノ酸の部分に欠失させた遺伝子を作成した。これらの改変FL01遺伝子のN末端領域は、「PCR実験マニュアル」(M. A. Innisら編、斉藤 隆監訳、HBJ出版、1991)のp.155~160に記載された、リコンビナントPCR法を用いて作成した。このようにして作成された改変FL01遺伝子のN末端領域の断片を、実施例3中のプラスミドTKNwtCSのHindIII~BamHI部位(GAL1のプロモーターとSc-FL01 C末断片の間)に正方向に連結し、酵母KY644株に導入した。得られた形質転換体の培養及び凝集性の評価は、実施例3と同様の方法で行った。結果を図9に示す。Sc-FL01遺伝子で数えて46、68、83番目のアミノ酸に相当する部分までがLg-FL01 遺伝子由来で、それ以降がSc-FL01 遺伝子由来であるキメラFL01遺伝子を持つ株(それぞれ、KY707、KY708、KY709)は、Sc-FL01 遺伝子を持つ株(KY706)と同様、強い実験酵母型凝集を示したのに対し、Sc-FL01 遺伝子で数えて124番目のアミノ酸(Lg-FL01遺伝子で数えた場合は97番目のアミノ酸)に相当する部分までがLg-FL01 遺伝子由来で、それ以降がSc-FL01 遺伝子由来であるキメラFL01遺伝子を持つ株は、実施例3に示したKY648株やKY646株と同様の、弱いビール酵母型凝集を示した。一方、Sc-FL01 遺伝子の84番目のアミノ酸から110番目のアミノ酸に相当する27アミノ酸の部分に欠失させた改変FL01遺伝子を持つKY711株は、弱い実験酵母型凝集を示した。以上の結果から、Lg-FL01 遺伝子のビール酵母型凝集に関与する部分は、Lg-FL01 遺伝子で数えて84番目のアミノ酸から97番目のアミノ酸までの14アミノ酸に相当する部分、すなわち配列表の配列番号2に示されたアミノ酸配列をコードする、配列番号4に示された配列であることが示された。

#### 【0063】

##### 【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：213

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

Met	Thr	Ile	Ala	His	His	Cys	Ile	Phe	Leu	Val	Ile	Leu	Ala	Phe	Leu
1					5					10				15	
Glu	Leu	Leu	Asn	Val	Ala	Ser	Gly	Ser	Thr	Gln	Ala	Cys	Leu	Pro	Val
			20						25				30		
Gly	Ser	Arg	Lys	Asn	Gly	Met	Asn	Val	Asn	Phe	Tyr	Lys	Tyr	Ser	Leu
			35				40					45			
Gln	Asp	Ser	Thr	Thr	Tyr	Ser	Asp	Pro	Gln	Tyr	Met	Ala	Tyr	Lys	Tyr
		50				55					60				
Ser	Asp	Thr	Lys	Lys	Leu	Gly	Ser	Val	Ser	Gly	Gln	Thr	His	Leu	Ser
65					70					75				80	

(14)

特開平 8-266287

25 26  
 Ile Tyr Tyr Gly Pro Asn Thr Ala Phe Trp Asn Thr Ala Ser Trp Ser  
 85 90 95  
 Ser Asp Leu Phe Gly Phe Tyr Thr Thr Pro Thr Asn Val Thr Val Glu  
 100 105 110  
 Met Thr Gly Tyr Phe Leu Pro Pro Gln Thr Gly Ser Tyr Thr Phe Lys  
 115 120 125  
 Phe Ala Thr Val Asp Asp Ser Ala Ile Leu Ser Val Gly Gly Ser Ile  
 130 135 140  
 Ala Phe Glu Cys Cys Ala Gln Glu Gln Pro Pro Ile Thr Ser Thr Asp  
 145 150 155 160  
 Phe Thr Ile Asn Gly Ile Lys Pro Trp Asp Ala Ala Ala Pro Thr Asp  
 165 170 175  
 Ile Lys Gly Ser Thr Tyr Met Tyr Ala Gly Tyr Tyr Tyr Pro Ile Lys  
 180 185 190  
 Ile Val Tyr Ser Asn Ala Lys Val Leu Ala Arg Leu Pro Val Ser Val  
 195 200 205  
 Val Leu Pro Asp Gly  
 210

【0064】配列番号：2

\* トポロジー：直鎖状

配列の長さ：14

20 配列の種類：ペプチド

配列の型：アミノ酸

\*

配列

Gly Pro Asn Thr Ala Phe Trp Asn Thr Ala Ser Trp Ser Ser

1

5

10

【0065】配列番号：3

※生物名：サッカロマイセス セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*)

配列の長さ：697

株名：KMS004

配列の型：核酸

配列の特徴

鎖の数：二本鎖

30 特徴を表す記号：CDS

トポロジー：直鎖状

存在位置：59. . 697

配列の種類：Genomic DNA

※ 特徴を決定した方法：E

起源

配列

GCTCTGCACT AAATTCGCA AATGATTTTC TTAAATTGA TTAGCACCAC TAAAAAAA 58  
 ATG ACA ATT GCA CAC CAC TGC ATA TTT TTG GTA ATC TTG GCC TTT CTG 106  
 Met Thr Ile Ala His His Cys Ile Phe Leu Val Ile Leu Ala Phe Leu  
 1 5 10 15  
 CAG CTA CTT AAC GTA GCA TCA GGA AGT ACA CAA GCA TGC CTG CCA GTG 154  
 Glu Leu Leu Asn Val Ala Ser Gly Ser Thr Gln Ala Cys Leu Pro Val  
 20 25 30  
 CGC TCG AGG AAA AAT GGG ATG AAT GTC AAC TTT TAT AAA TAC TCA TTA 202  
 Gly Ser Arg Lys Asn Gly Met Asn Val Asn Phe Tyr Lys Tyr Ser Leu  
 35 40 45  
 CAG GAT TCA ACA ACG TAT TCC GAC CCG CAA TAT ATG GCC TAT AAA TAC 250  
 Gln Asp Ser Thr Thr Tyr Ser Asp Pro Gln Tyr Met Ala Tyr Lys Tyr  
 50 55 60  
 TCC GAT ACA AAG AAG TTA GGT TCC GTT AGC GGA CAG ACC CAT CTC TCC 298  
 Ser Asp Thr Lys Lys Leu Gly Ser Val Ser Gly Gln Thr His Leu Ser  
 65 70 75 80



27 28  
 ATA TAC TAT GGC CCA AAT ACT GCC TTT TGG AAT ACT GCC TCT TGG AGT 346  
 Ile Tyr Tyr Gly Pro Asn Thr Ala Phe Trp Asn Thr Ala Ser Trp Ser  
 85 90 95  
 TCT GAT CTT TTT GGT TTC TAT ACT ACT CCA ACT AAT GTA ACT GTG GAA 394  
 Ser Asp Leu Phe Gly Phe Tyr Thr Thr Pro Thr Asn Val Thr Val Glu  
 100 105 110  
 ATG ACA GGG TAC TTT TTA CCA CCA CAG ACG GGT TCT TAC ACA TTC AAG 442  
 Met Thr Gly Tyr Phe Leu Pro Pro Gln Thr Gly Ser Tyr Thr Phe Lys  
 115 120 125  
 TTT GCT ACA GTT GAC GAC TCT GCA ATT TTA TCG CTT GGT GGT ACC ATT 490  
 Phe Ala Thr Val Asp Asp Ser Ala Ile Leu Ser Val Gly Gly Ser Ile  
 130 135 140  
 GCG TTC GAA TGT TGT GCA CAA GAA CAA CCT CCT ATC ACA TCA ACG GAT 538  
 Ala Phe Glu Cys Cys Ala Gln Glu Gln Pro Pro Ile Thr Ser Thr Asp  
 145 150 155 160  
 TTC ACT ATT AAC GGT ATT AAA CCA TGG GAC GCA GCT GCA CCT ACC GAC 586  
 Phe Thr Ile Asn Gly Ile Lys Pro Trp Asp Ala Ala Ala Pro Thr Asp  
 165 170 175  
 ATA AAG GCG TCA ACG TAC ATG TAC GCC CGT TAC TAT TAC CCG ATC AAA 634  
 Ile Lys Gly Ser Thr Tyr Met Tyr Ala Gly Tyr Tyr Tyr Pro Ile Lys  
 180 185 190  
 ATT GTT TAT TCA AAT GCT AAA GTC TTG GCT AGG CTT CCT GTT AGT GTG 682  
 Ile Val Tyr Ser Asn Ala Lys Val Leu Ala Arg Leu Pro Val Ser Val  
 195 200 205  
 GTA TTG CCA GAT GGA 697  
 Val Leu Pro Asp Gly  
 210

【0066】配列番号：4

配列の長さ：42

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

起源

配列

GGC CCA AAT ACT CCC TTT TGG AAT ACT GCC TCT TGG AGT TCT 42  
 Gly Pro Asn Thr Ala Phe Trp Asn Thr Ala Ser Trp Ser Ser  
 1 5 10

【区面の簡単な説明】

【図1】ビール酵母およびその減数対のFL01遺伝子に関するサザンおよびノザン解析による電気泳動の結果（写真）を示す。

【図2】Lg-FL01 遺伝子の制限酵素地図を示す。

【図3】inverse PCR によるLg-FL01 遺伝子の全長クローニングの概念図を示す。

【図4】Lg-FL01 遺伝子全長断片の制限酵素地図を示す。

\* 生物名：サッカロマイセス セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*)

30 株名：KMS004

配列の特徴

特徴を表す記号：CDS

存在位置：1. . 42

\* 特徴を決定した方法：E

40 【図5】Lg-Sc-キメラFL01遺伝子構築の概念図を示す。

【図6】Lg-FL01 遺伝子破壊用プラスミドの構築図を示す。

【図7】Lg-FL01 遺伝子破壊用プラスミドの構築図（続き）を示す。

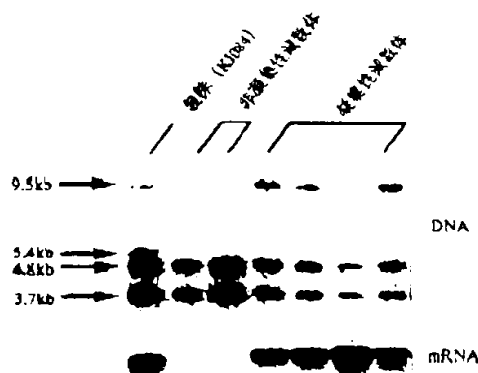
【図8】Lg-FL01 遺伝子とSc-FL01 遺伝子のN末部分の推測されるアミノ酸配列の比較を示す。

【図9】各種の改造型 FL01 遺伝子を持つ株の凝集の表現型を示す。

(16)

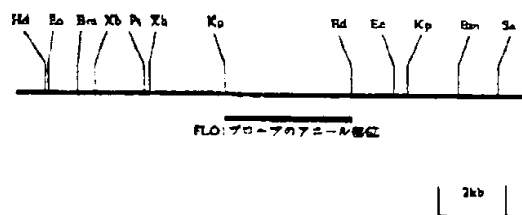
特開平 8-266287

【図1】



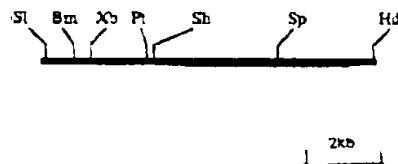
ヒール探査およびその減数体のFLO1遺伝子に関する  
サザンおよびノザン解析の結果

【図2】



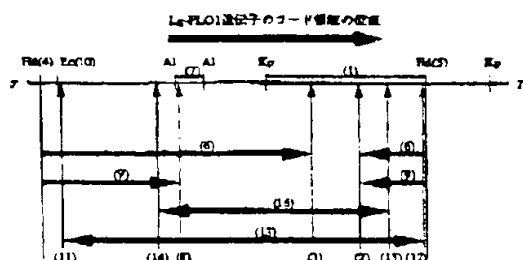
Lg-FLO1遺伝子の制限酵素地図  
図中、番号は以下の制限酵素部位を示す。Bst: BstXI, EcoRI, EcoRV, HhaI, HindIII, KpnI, PstI, SalI, XbaI, XbaI, XbaI, XbaI  
減数体の位置と、FLO1プロローブのアニール部位から最も近い制限酵素部位以外は、その存在がなくても示さない。

【図4】



Lg-FLO1遺伝子全長断片の制限酵素地図  
図中の略号は以下を示す。Bst: BstXI, Pst: PstI, Sfi: SfiI, Spe: SpeI, Sfi: SfiI, Xba: XbaI  
SfiI部位はプライマーに付与されたもので、変性体中には存在しない。

【図3】

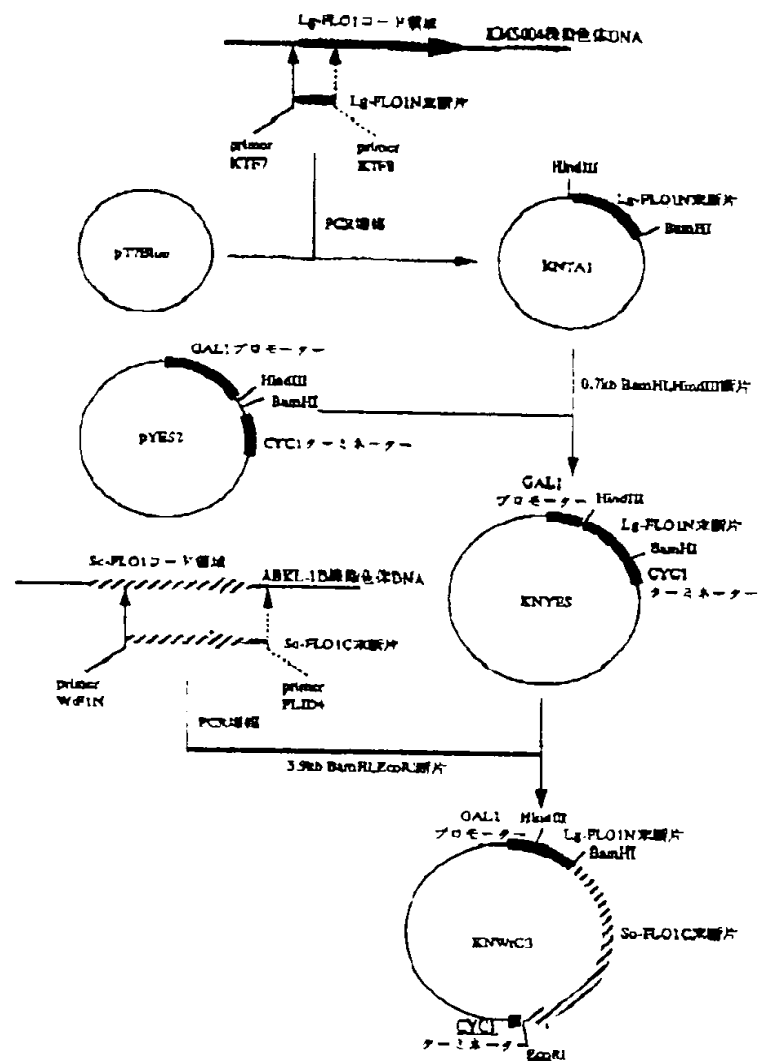


Southern PCRによるLg-FLO1遺伝子の全長のクローニングの検出  
図中の数字の数字は本文参照のこと。図中、上向きの矢印はプライマーの位置を示す（矢印は「ア」、矢印は「ア」の両方のプライマーを示す）。太い矢印の矢印はPCR断片を示す。番号はそれぞれ以下の制限酵素部位を示す。HhaI: HhaI, EcoRI: EcoRI, Alu: AluI, KpnI: KpnI

(17)

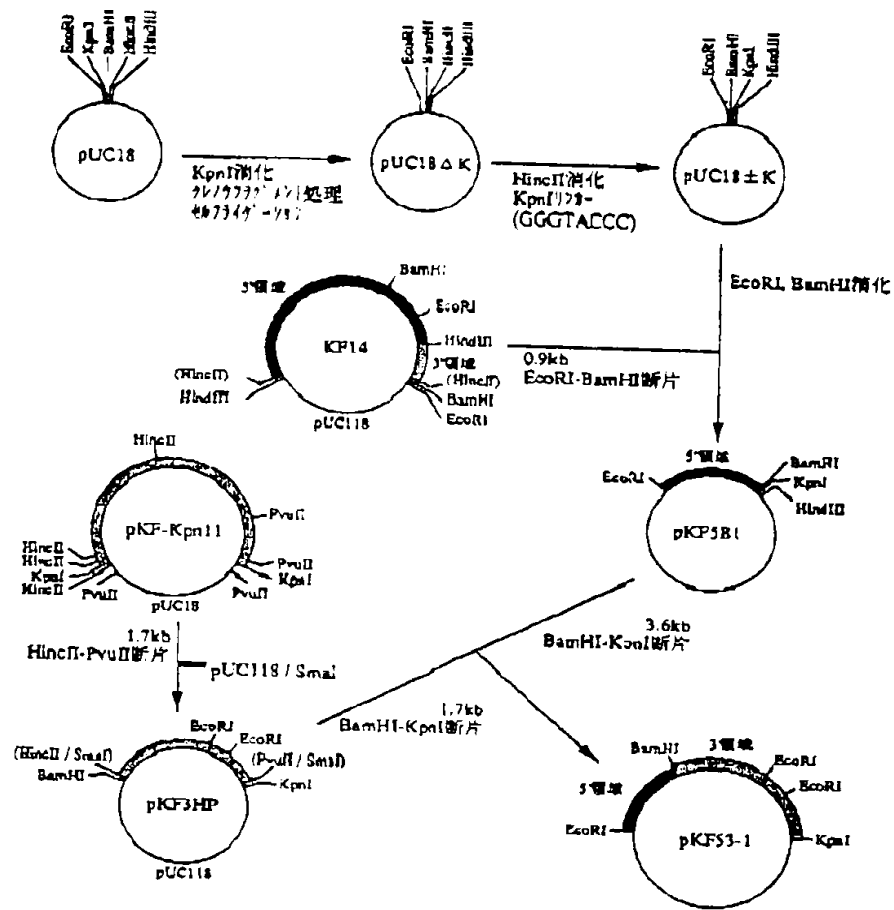
特開 8-266287

【図5】



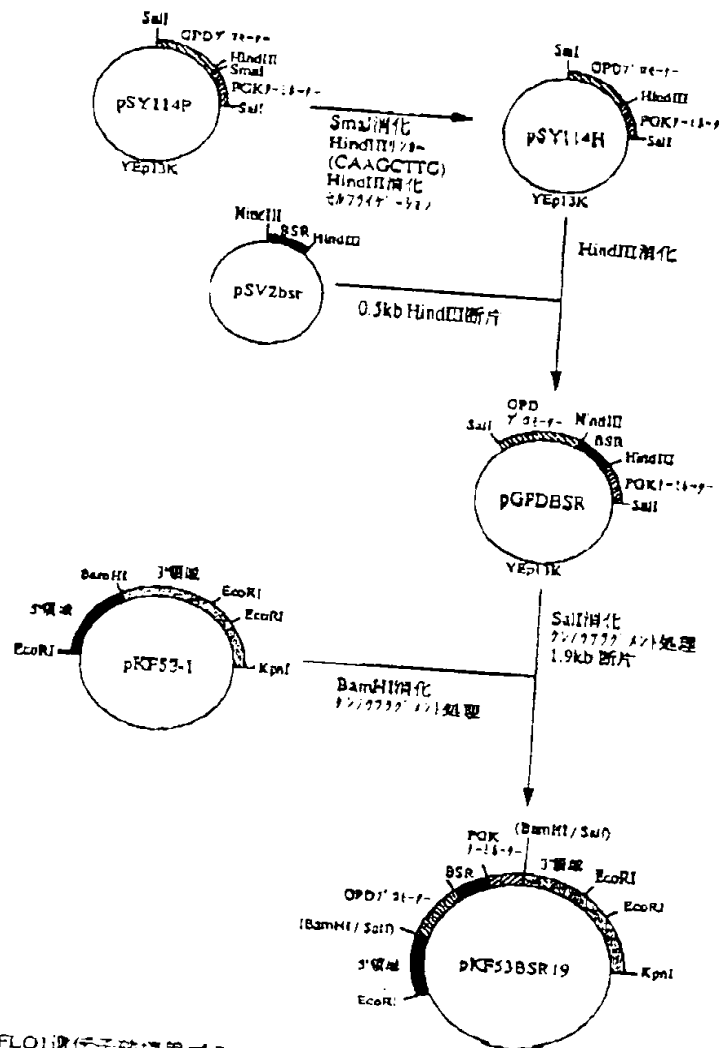
Lg-Sc-キメラFLO1遺伝子構築の概念図

【図6】



Lg-FLO1遺伝子破壊用プラスミドの構築

【図7】



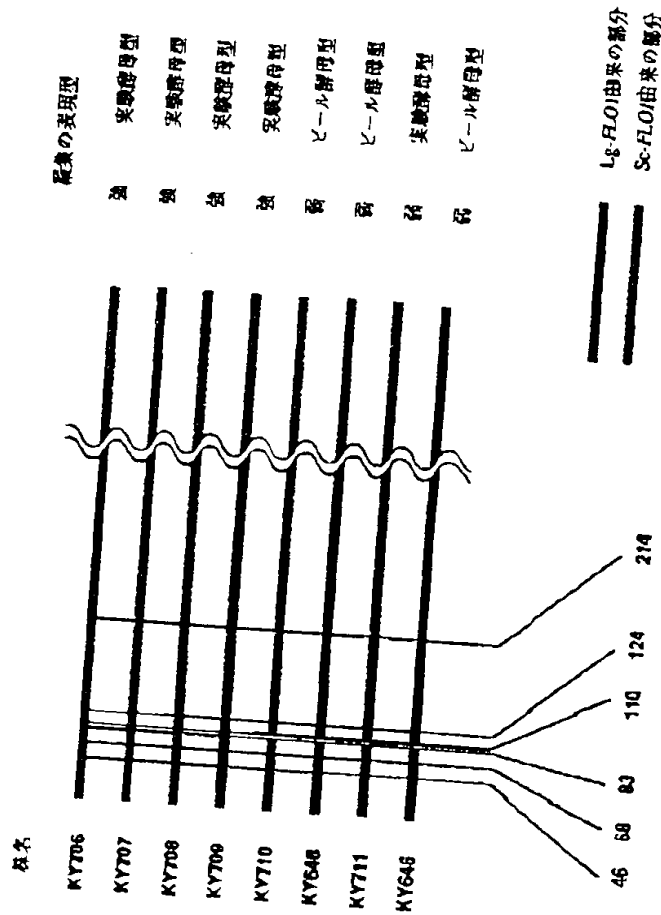
Lg-FLO1遺伝子破壊用プラスミドの構築 (続き)

【図8】

	10	20	30	40	50	60
Lg-FLO1	MTIAHNCIFLUIIAFLEILLNVASG	STOACLPUCSRIQICAVMEFYKYS	LQOSTTYS	SDPQYM		
Sc-FLO1	X:.....					
	70	80	90	100	110	120
Lg-FLO1	AYKYSOTKRLG	SVSCQTHLSIYY	-----			
Sc-FLO1	AYGYASNTKLQ	SVGGQTDISIDYNIPCVSSSGTFF	CDPQEDSYGNWCKQMCACS	NSQGIA		
	130	140	150	160	170	180
Lg-FLO1	SNSSCLFCFY	TTPTNVTYEMTGXFLPPQTG	SYTFKATVDD	SAILSVGG	SLAF	ECCEAQEQ
Sc-FLO1	YWSCLFCFY	TTPTNVTLEMTGXFLPPQTG	SYTFKATVDD	SAILSVGG	ATAF	NCCAQEQ
	190	200	210	220	230	240
Lg-FLO1	PPITSTDF	TINGIKPWDAAP	TDIKGSTYMYAGY	YPIKIVYSNAK	VLAKLPVSV	VLDPG
Sc-FLO1	PPITSTNET	EDGIRPWGGS	LPPNIEGTVMYAGY	YPMVVY	SNVSVNGT	LPISVTLDPG

Lg-FLO1遺伝子とSc-FLO1遺伝子のN末部分の推測されるアミノ酸配列の比較

【图9】



各種のは造型FLの遺伝子を持つ株の蓄集の表現型

各種の改造型FLの遺伝子はCAL遺伝子の下位に連結し、FLの遺伝子を破壊した実験条件下に導入し、商業性の新種を行なつた。商業の表現型は、強時に例しては、繁殖母程度のもを他、ヒール層は程度のものゝとて、それぞれ表し、また他に有る原因に関しては、マンノースによって阻害されるがグルコースによつて阻害されないものとを区別する。マンノースによる阻害を示す。SC-FLの遺伝子と比較した場合、lg FLの遺伝子には84—1107ミノ間の部分が大失しているが、N末から数えたアミノ酸数はSC-FLの遺伝子に換算して致さずである。

フロントページの続き

(51) Int.Cl. 6

C 1 2 P 21/02  
 //(C 1 2 N 15/09  
 C 1 2 R 1:865)  
 (C 1 2 N 1/19  
 C 1 2 R 1:865)  
 (C 1 2 P 21/02  
 C 1 2 R 1:865)

識別記号

室内整理番号

FI

C 1 2 P 21/02

技術表示箇所

C